

氏名	竹 内 加 珠
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 7 7 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Porphyromonas gingivalisの外膜蛋白におけるT細胞エピトープに関する研究
論文審査委員	教授 北山 滋雄 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

歯周病患者が *Porphyromonas gingivalis* に由来する各種の抗原に対して示す特異的な免疫応答性は、様々な角度から分子レベルで調べられてきた。なかでも、分子量 53kDa の外膜蛋白 (Ag53) は、歯周病患者に強い体液性免疫を誘導する抗原である。現在までに、1) 多くの早期発症型歯周炎 (EOP) 患者のヘルパーT (Th) 細胞および血清が Ag53 上の共通した領域 (p141-161) を認識すること、また、2) この領域は、日本人の EOP 患者で高頻度に検出される HLA クラス II 遺伝子型 (HLA-DRB1*1501) を有する Th 細胞によって認識されやすいこと、さらに、3) それら Th 細胞が産生するサイトカインのプロファイルが明らかとなった。

一方、Th 細胞の抗原認識機構はファジーな側面も有しているため、野生型抗原ペプチドのアミノ酸数残基を置換したペプチド (アナログペプチド) の一部は Th 細胞の応答に量的および質的な変化を誘導することが可能である。この事実は、免疫に関わる様々な疾患の治療において T 細胞応答性を制御することに応用できるばかりでなく、野生型の抗原蛋白と交差応答性を示す分子擬態抗原蛋白を同定することをも可能とする。このことを歯周病の研究に応用して、歯周病における免疫病理的な病態解明およびアナログペプチドを用いた免疫療法への発展を考えた場合、Ag53 は格好のモデルとなり得る。しかし、Ag53 上で EOP 患者の Th 細胞が共通して認識する領域は分かっているものの、その抗原認識に関わる抗原ペプチド (T 細胞エピトープ) の詳細な領域は明らかになっていない。

そこで本研究は、EOP 患者由来の Th 細胞クローンを用いて、1) Ag53p141-161 における詳細な T 細胞エピトープを同定し、2) 同定し得たエピトープ領域のアナログペプチドに対する応答性を調べることを目的とし、歯周病の病態解明およびペプチド免疫療法への発展を考えた。

【材料および方法】

1. Th 細胞クローン：HLA-DRB1*1501 分子の拘束を受けて Ag53p141-161 を認識する Th 細胞クローン (HT8.3) を EOP 患者から得た。すなわち、HLA-DRB1*1501 遺伝子型を有する EOP 患者の末梢血単核球を抗原ペプチド (Ag53p141-161) と共培養し、抗原ペプチドを提示させた自己由来抗原提示細胞と、IL-2 および IL-4 存在下で継代培養を行なった後、限界希釈したものを同じ条件でさらに継代培養することによって樹立した。なお、対照として HLA-DRB1*0803 分子拘束性の Th 細胞クローン (HT6.2) も同様に樹立して用いた。
2. Ag53 由来合成ペプチド：Ag53p141-161 の C 末端、N 末端および両末端のアミノ酸を 1~12 残基切除したペプチド、さらに Ag53 のエピトープ領域の一残基置換ペプチドを F-moc 法によって Peti-Szyer (島津) を用いて合成した。また、このアミノ酸配列をデータベースに照合することによって相同性の高い既知のペプチドを検出して合成した。さらに、T 細胞レセプター (TCR) との会合に関わる部位をランダム化したコンビナトリアル・ペプチド・ライブラリーを作製して合

成した。このペプチド混合物から逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて疎水度の違いによって分画し得た画分を抗原標品とした。

3. Th 細胞応答性の評価：抗原刺激に対する Th 細胞クローンの応答性は、各種抗原標品存在下で自己由来単核球と共培養したときの増殖活性およびサイトカイン産生性をもって評価した。増殖活性は、3 日間培養後の³H]-thymidine の取り込み量をもって、またサイトカイン産生性は、2 日間培養後の培養上清中に含まれる IFN- γ および IL-4 量をそれぞれ市販の ELISA kit（ENDOGEN）を用いて測定した。

【結果および考察】

1. Ag53p141-161 に存在する T 細胞エпитープの決定

Ag53p141-161 の末端からアミノ酸を切除したペプチドに対する Th 細胞クローンの応答性を調べることによって決定した。HT8.3 は、C 末端から 6 残基、N 末端から 3 残基切除した 12 残基のペプチド（Ag53p144-155）に対して全長と同程度の増殖活性を示したが、それより多く切除したペプチドに対しては低下した。また IFN- γ および IL-4 産生量は、増殖活性と同様の变化を示した。以上より、この領域が T 細胞エпитープであった。なお、HT6.2 もほぼ同じ領域を認識したことから、この領域は複数の HLA 分子に提示されやすいと考えられる。

2. T 細胞エпитープにおける TCR との会合部位の決定

Ag53p144-155 の各アミノ酸を極性の異なるアミノ酸に一残基ずつ置換したペプチドを抗原としたときの HT8.3 の応答性を調べることによって決定した。HT8.3 は、146 番目から 153 番目の各アミノ酸を置換したペプチドに対して増殖活性およびサイトカイン産生性を示さなくなった。このことから、この範囲に TCR との会合に関わる部位が存在した。

3. 一残基置換アナログペプチドに対する Th 細胞クローンの応答性

TCR との会合に関わる部位を、cysteine（C）を除く 19 種類のアミノ酸にそれぞれ一残基置換したペプチドを抗原としたときの HT8.3 の応答性を調べた。HT8.3 は、147 番目の valine（V）を isoleucine（I）に、151 番目の alanine（A）を glycine（G）にそれぞれ置換した 2 種類のペプチドに対してのみ増殖活性およびサイトカイン産生性をともに示した。なお、その応答性は、抗原濃度の変化に関わらず野生型ペプチドと同程度であった。また、これら 2 種類のペプチドとのアミノ酸配列と 50%を超える相同性を有する既知の蛋白は存在しなかった。

4. 多残基置換アナログペプチドに対する Th 細胞クローンの応答性

Ag53p144-155 の各アミノ酸を性質が類似するアミノ酸に置換した場合のアミノ酸配列と相同性を有する蛋白は 11 種類検出されたが、これらに対して HT8.3 は増殖活性を示さなかった。そこで、作製したコンビナトリアル・ペプチド・ライブラリーを、HPLC を用いて 25 に分画した各画分を抗原としたときの HT8.3 の応答性を調べた。HT8.3 は、野生型ペプチドおよび増殖活性を誘導したアナログペプチドを含む画分とは異なる複数の画分に対しても増殖活性を示し、また、低いサイトカイン産生性を示す画分が存在した。このことから、歯周病の病態に分子擬態蛋白が関与する可能性が示唆された。しかし、応答性を示す画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列は決定されておらず、その解明が必要である。さらに、応答性を量的および質的に変化させるように制御することが可能となれば、治療法の開発に繋がれると考える。

【結論】

Ag53p141-161 における T 細胞エпитープ領域は Ag53p144-155 であることを明らかにした。また、この領域のアミノ酸配列に基づいたアナログペプチドに対する Th 細胞の応答性を評価することによって、歯周病の病態解明およびペプチド免疫療法へ応用できる可能性を示した。

論文審査結果の要旨

ヘルパーT (Th) 細胞が認識する特異的抗原に関して分子レベルで解析されるようになってきた。歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* に由来する抗原においても、早期発症型歯周炎 (EOP) 患者の Th 細胞および B 細胞が反応する抗原蛋白 (Ag53) が同定され、それらの共通な認識領域 (p141-161) が報告されている。また近年、野生型抗原ペプチドのアミノ酸に類似したペプチドを用いて応答性を調節することが、免疫関連疾患の診断および治療に応用されている。

本研究は、Ag53p141-161 において、EOP 患者の Th 細胞の抗原認識に関わる詳細な領域を決定し、さらに、決定した領域のアミノ酸配列に基づいたアナログペプチドに対する Th 細胞の応答性を調べたものである。

得られた結果は次の通りである。1) Ag53p141-161 において、Ag53p144-155 が Th 細胞の応答を規定する T 細胞エピトープである。2) Ag53p144-155 において、p147,148,149,150,151 および 153 に位置するアミノ酸残基が T 細胞レセプター (TCR) との会合に関わって Th 細胞に認識されると推測される。3) 野生型抗原ペプチドと同程度に応答性を示す一残基置換アナログペプチドを同定したが、これらのアミノ酸配列と相同性が高い分子擬態蛋白はデータベース上に存在していない。4) アミノ酸配列は決定されていないが、質的な変化を伴って応答性を示す多残基置換アナログペプチドが存在する。

これらの結果から、Ag53p141-161 上に存在する T 細胞エピトープを同定した。また、そのアナログペプチドに対する Th 細胞の応答性を評価し、歯周病の病態に分子擬態蛋白が関与する可能性、および *Porphyromonas gingivalis* に対するペプチド免疫療法へ発展させる可能性を示した。

以上によって、本申請論文は学位論文として価値があると認めた。